

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

日本人妊娠糖尿病発症女性における糖尿病・妊娠糖尿病関連遺伝子に関する研究

研究分担者 宮越 敬 慶應義塾大学医学部産婦人科 専任講師

研究要旨

近年、諸外国では分子遺伝学的解析手法を用いて妊娠糖尿病 (GDM) の遺伝因子の同定が試みられている。一般に、疾患発症に関与する遺伝因子の頻度は人種間で異なるため、日本人 GDM の病態解明には日本人妊婦の集団における独自の遺伝因子関連解析が不可欠である。しかしながら、本邦ではこのような観点からの GDM 感受性遺伝因子の網羅的な解析は行われていない。今回我々は、日本人妊婦 (GDM: 174 名、正常耐糖能群: 554 名) を対象に既知の糖尿病関連候補遺伝子 (計 13 遺伝子) について多型情報を取得し、GDM との関連を検討した。本検討では全例で塩基配列解析を行うことができ、ケース・コントロール関連解析の結果、膵臓形成に関与する遺伝因子に関して GDM および正常耐糖能群間でアレル頻度差を認めた。今後、さらに症例を集積して、日本人 GDM 発症に関与する遺伝因子を同定するとともに、遺伝子多型を反映する臨床情報を抽出し日本人 GDM 既往女性の予後予測および産後のフォローアップ体制の構築を目指す予定である。

研究協力者

秦健一郎 (独立行政法人国立成育医療研究センター、周産期病態研究部)

右田王介 (独立行政法人国立成育医療研究センター、周産期病態研究部)

関根章博 (京都大学大学院医学研究科 EBM 研究センター ファーマコゲノミクスプロジェクト)

A. 研究目的

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) とは、DNA において 1 箇所の塩基配列が別の塩基に置換している状態である (図 1)。この SNP が遺伝子およびタンパクの働きの違い、そして病

気になりやすさの違いに関与すると考えられている。そのため、SNP 解析は疾患に関与する遺伝子の同定、すなわち病因の解明に繋がるとされる。

疾患の発症には遺伝要因と環境要因が関わっており、多くは両者が複雑に関与する多因子疾患である (図 2)。これまで、高血圧や 2 型糖尿病 (T2DM) において SNP 解析や全ゲノム関連解析 (genome wide association study: GWAS) を中心とした分子遺伝学的解析手法を用いて、疾患関連候補遺伝子の探索が行われてきた [1, 2]。例えば、膵細胞機能不全と慢性的なインスリン感受性低下を認める T2DM の発症には、膵細胞およびインスリン感受性関

連の遺伝因子の関与が指摘されている(図3)。また、T2DM と類似した病態を示す妊娠糖尿病 (GDM) にも遺伝要因の関与が推測され、欧米人・アジア人を対象とした多型解析例も報告されている[3,4]。

一般に、疾患発症に関与する遺伝因子の頻度は人種間で異なるため、日本人 GDM の病態解明には日本人妊婦の集団における独自の遺伝因子関連解析が不可欠である。しかしながら、本邦ではこのような観点からの GDM 感受性遺伝因子の網羅的な解析は行われていない。本研究の目的は、既知の糖尿病関連遺伝子の SNP に着目して日本人 GDM および正常耐糖能 (NGT) の SNP 解析を行うことである。

B. 研究方法

対象：2011 年 1 月以降に当院で周産期管理を行い、本研究について同意の得られた日本人単胎妊婦 728 名 (GDM : 174 名、NGT : 554 名) である。GDM の診断には 2010 年 7 月に発表されたいわゆる新診断基準を用い、明らかな糖尿病合併例は対象から除外した。なお、対象例の臨床情報は当院の周産期データベースより抽出した。

方法:(1)分娩後に母体末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。(2)得られた DNA を用いて、表 1 に示す既知の計 13 遺伝子の SNP (*HHEX* および *ADIPOQ* については 2 箇所) について Invader 法 (Third Wave Technologies 社) により塩基配列解析を行った。Invader 法はミレニアム・ゲノムプロジェクトや国際 HapMap プロジェクトにおいても採用された簡便かつ高精度の SNP 解析法である

(<http://hologic.co.jp/invader/>) (3) 塩基配列解析結果をもとに、GDM および NGT においてアレル頻度を比較検討した (ケース・コントロール関連解析) なお、統計学的検討にはカイ二乗検定を用い、 $P < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究分担者の所属機関である慶應義塾大学医学部の倫理審査委員会の承認を得て実施された (承認番号 20130160)。また、本研究では研究協力者に新たな負担は発生せず、かつ個人情報の保護に万全を期すことにより不利益も生じない。

C. 研究結果

表 2 には両群の母体背景を示す。NGT 群に比べ GDM 群の BMI (kg/m^2) は有意に高値 (20.1 ± 2.4 vs 21.9 ± 3.5 , $P < 0.0001$) であり、GDM 群では肥満妊婦 (BMI ≥ 25) が高率であった (17.8% vs 4.2% , $P < 0.0001$)。また、GDM 群では糖尿病家族歴が有意に高頻度 (25.2% vs 7.2% , $P < 0.0004$) であった。

塩基配列解析では、全例において異なるアレルが明瞭に分離され、塩基配列の同定が可能であった。図 4 にはその一例を示す。また、ケース・コントロール関連解析の結果、インスリン感受性に関連する 3 遺伝子 (*PPAR*、*FTO*、*ADIPOQ*) の SNP について

は、両群間でアレル頻度に偏りを認めなかった(表3)。一方、膵細胞関連の遺伝子(*HHEX*, *KCNJ11*, *TCFL2*, *IGFBP2*, *GCK*, *CDKAL1*, *CDKN2A*, *KCNJ15*, *KCNQ1*, *SCL30A8*)に関しては、*HHEX*のみに両群間でアレル頻度に偏りを認めた。

D. 考察

近年、GWASを用いた多因子疾患関連遺伝因子の同定が試みられているが、同手法には疾患群および正常対照群、ともに少なくとも1000~1500症例を要する。臨床研究においてGWASを実施可能なGDM症例を収集することは困難であることが多いため、GDM感受性遺伝因子の探索は糖尿病関連のSNPを中心としたケース・コントロール関連解析が主流である。例えば、Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome studyのサブグループ解析ではインスリン分泌に関与する*GCK*が欧米人GDMの発症に関与する可能性が示された[5]。また、最近発表されたsystematic reviewによると、*TCF7L2*, *GCK*, *KCNJ11*, *CDKAL1*, *IGFBP2*, Melatonin receptor 1B(*MTNR1B*)、Insulin receptor substrate(*IRS1*)の遺伝子多型がGDM発症に関与するものと推測されている[4]。

本検討では、既知の代表的な糖尿病関連遺伝子のSNPに着目して塩基配列解析およびケース・コントロール関連解析を行った。まず、全例においてアレルのシグナルが明瞭に分離され、本検討で構築した臨床遺伝情報解析体制がSNP解析に有用であることが確認された。また、関連解析の結果、*HHEX*のみに両群間でアレル頻度に偏

りを認めた。なお、同遺伝子における2箇所のSNPに関し、GDM発症のオッズ比(95%信頼区間)は1.87(1.09-3.21)および2.64(1.14-6.14)であった。

2011~2012年に施行した我々の予備検討では、インスリン感受性関連の*PPAR*および*FTO*、膵細胞関連の*HHEX*, *KCNJ11*, *IGFBP2*および*GCK*がGDM発症に関与すると推測された[6,7]。予備検討に比べ、本検討の対象症例数はGDMおよびNGT群ともに約2倍となった。膵臓・肝臓となるとなる前腸に発現する転写因子をエンコードする*HHEX*は、胎生期の膵臓形成への関与が推測される遺伝子である[8]。インスリン分泌不全が日本人T2DMの特徴であることを勘案すると、*HHEX*は日本人GDMの病態形成に関与する有力な候補遺伝因子と考えられた。

興味深いことに日本人T2DMとの関連が指摘されている遺伝子すべてがGDMと強く関連するわけではなかった(図5)。このことから、既知のT2DM関連遺伝子の中には日本人GDMと強い関連を示す因子が存在し、SNP解析によるGDM感受性候補遺伝因子特定が日本人GDMの病態解明に結びつく可能性が示された。

一般にケース・コントロール関連解析には疾患および正常対照群それぞれ数百症例を必要とするため、今後も引き続き症例を集積予定である。諸家のSNP解析では中高年健常女性が正常対照集団とされている。GDM感受性候補遺伝因子の探索には、“妊娠”という同一の環境要因下での遺伝因子頻度の比較が望ましい。したがって、中高年健常女性ではなく正常耐糖能妊婦

を正常対照集団としていることは我々の検討の特色の1つである。

膵細胞機能は経口糖負荷試験における血糖・インスリン値から評価可能である[9]。我々は、膵細胞機能指標(Oral Disposition Index)を用いて欧米人同様に日本人GDM例においても膵細胞機能不全を認めることを報告してきた[7,10]。本検討対象を用いた予備解析では、膵細胞機能指標とHHEXの多型との因果関係も示唆された(未発表データ)。したがって、GDM診断時の膵細胞機能指標は遺伝子多型を反映するものと推測される。

GDM既往女性はT2DMのリスクが高いため、ライフスタイル改善を含む早期治療介入が必要と考えられる[11]。しかしながら、現在まで産後フォローアップ体制は未構築であり、耐糖能検査受診率は低い。大規模集団における遺伝因子探索および遺伝子多型を反映した膵細胞機能指標のカットオフ値設定はGDM既往女性の予後予測および産後のフォローアップ体制の構築にも有用と考えられる。

E. 結論

今回我々は、日本人妊婦を対象に既知の糖尿病関連候補遺伝子(計13遺伝子)について多型情報を取得し、GDMとの関連を検討した。ケース・コントロール関連解析の結果、膵臓形成に關与する遺伝因子“HHEX”が日本人GDM発症に關与する有力な候補遺伝因子と考えられた。

F. 参考文献

1. Imamura M, Maeda S. Genetics of

type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. *Endocr J.* 2011;58:723-739.

2. McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med.* 2010;363:2339-2350.

3. Kwak SH, Kim SH, Cho YM, et al. A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women. *Diabetes.* 2012;61:531-541.

4. Zhang C, Bao W, Rong Y, et al. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Human reproduction update.* 2013;19:376-390.

5. Freathy RM, Hayes MG, Urbanek M, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: common genetic variants in GCK and TCF7L2 are associated with fasting and postchallenge glucose levels in pregnancy and with the new consensus definition of gestational diabetes mellitus from the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. *Diabetes.* 2010;59:2682-2689.

6. 宮越敬, 田中守, 前原佳代子, et al. 日本人妊娠糖尿病における一塩基多型解析の試み. *糖尿病と妊娠.* 2012;12:96-98.

7. 宮越敬. 膵細胞機能に着目した metabolic phenotype の検討. *日本産科婦人科学会雑誌.* 2012;64:2265-2278.

8. Staiger H, Machicao F, Fritsche

A, et al. Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev.* 2009;30:557-585.

9. Retnakaran R, Qi Y, Goran MI, et al. Evaluation of proposed oral disposition index measures in relation to the actual disposition index. *Diabet Med.* 2009;26:1198-1203.

10. Saisho Y, Miyakoshi K, Tanaka M, et al. Beta cell dysfunction and its clinical significance in gestational diabetes. *Endocr J.* 2010; 57:973-980.

11. Ratner RE, Christophi CA, Metzger BE, et al. Prevention of diabetes in women with a history of gestational diabetes: effects of metformin and lifestyle interventions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4774-4779.

G . 研究発表

論文発表

1. 宮越敬, 税所芳史, 吉村泰典. 産後のフォローアップ. 月刊糖尿病. 東京: 医学出版社; 2013. p. 61-66.
2. 宮越敬, 池ノ上学, 春日義史, et al. 妊娠時の代謝の変化 1. 母体の変化 A. 糖代謝の変化 2) インスリン感受性の観点から. In: 難波光義, 杉山隆, editors. 「妊娠と糖尿病」母児管理のエッセンス. 京都: 金芳堂; 2013. p. 38-42.
3. 税所芳史, 宮越敬, 吉村泰典, et al. ホルモン療法実践マニュアル「糖尿病・妊娠糖尿病」. In: 青木大輔, 金

山尚裕, 百枝幹雄, 若槻明彦, editors. 産科と婦人科. 東京: 診断と治療社; 2013. p. 57-66.

4. 池ノ上学, 宮越敬, 税所芳史, et al. 当院における新診断基準導入後の妊娠糖尿病の臨床像に関する検討. 糖尿病と妊娠. 2013;13:84-87.
5. 宮越敬, 税所芳史, 池ノ上学, et al. 妊娠糖尿病既往女性における産後早期糖代謝異常の発症に関する検討. 糖尿病と妊娠. 2013;13:88-92.
6. Saisho Y, Miyakoshi K, Ikenoue S, et al. Marked decline in beta cell function during pregnancy leads to the development of glucose intolerance in Japanese women. *Endocr J.* 2013;60:533-539.
7. Ikenoue S, Miyakoshi K, Saisho Y, et al. Clinical impact of women with gestational diabetes mellitus by the new consensus criteria: two year experience in a single institution in Japan. *Endocr J.* 2014, in press.

学会発表

1. 池ノ上学, 宮越敬, 春日義史, et al. 妊娠糖尿病の血糖プロフィールならびにインスリン導入予測因子に関する検討. 第 65 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 2013 年 5 月, 札幌.
2. 全国妊娠糖尿病研究グループ. 妊娠糖尿病 1 点異常に対する管理に関する後方視的検討: JGSG study. 第 65

回日本産科婦人科学会総会・学術講演会，2013年5月，札幌．

3. 宮越敬，安日一郎，釘島ゆかり，et al. アンケート調査からみた妊婦健診時の耐糖能異常スクリーニングと妊娠糖尿病管理の現状．第49回日本周産期新生児医学会総会・学術集会，2013年7月，横浜．
4. 池ノ上学，宮越敬，春日義史，et al. 当院における基準改定後の妊娠糖尿病Screeningの現状．第49回日本周産期新生児医学会総会・学術集会，2013年7月，横浜．
5. 宮越敬，安日一郎，釘島ゆかり，et al. 全国分娩取り扱い施設を対象とした耐糖能異常スクリーニングおよび妊娠糖尿病管理に関するアンケート調査報告．第29回日本糖尿病妊娠学会年次学術集会，2013年11月，岐阜．

2. 実用新案登録

本年度はなし

3. その他

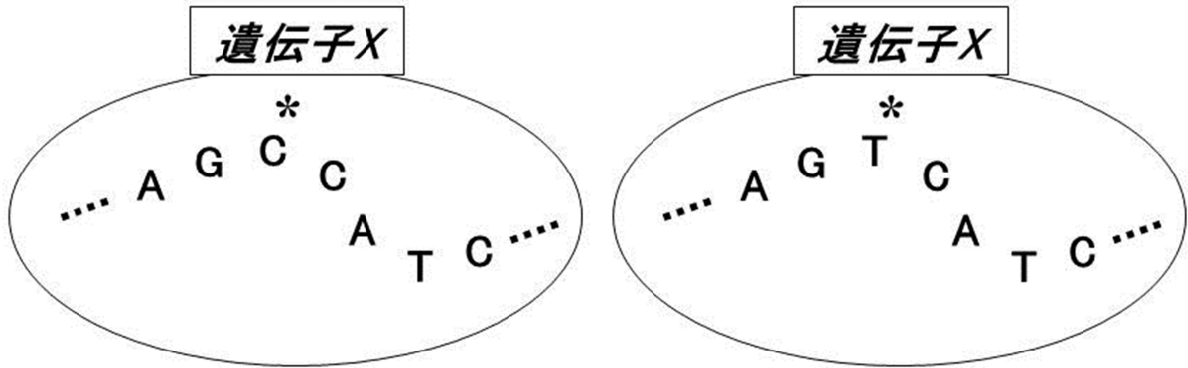
本年度はなし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

本年度はなし

図1 一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism)



SNP: DNAにおいて1箇所の塩基配列が別の塩基に置換

疾患群 vs 対照群

SNP頻度の差 (=アレル頻度の偏り) あり



SNPが疾患の病態に関与する可能性あり

(SNP: single nucleotide polymorphism)

図2 疾患の発症と遺伝要因

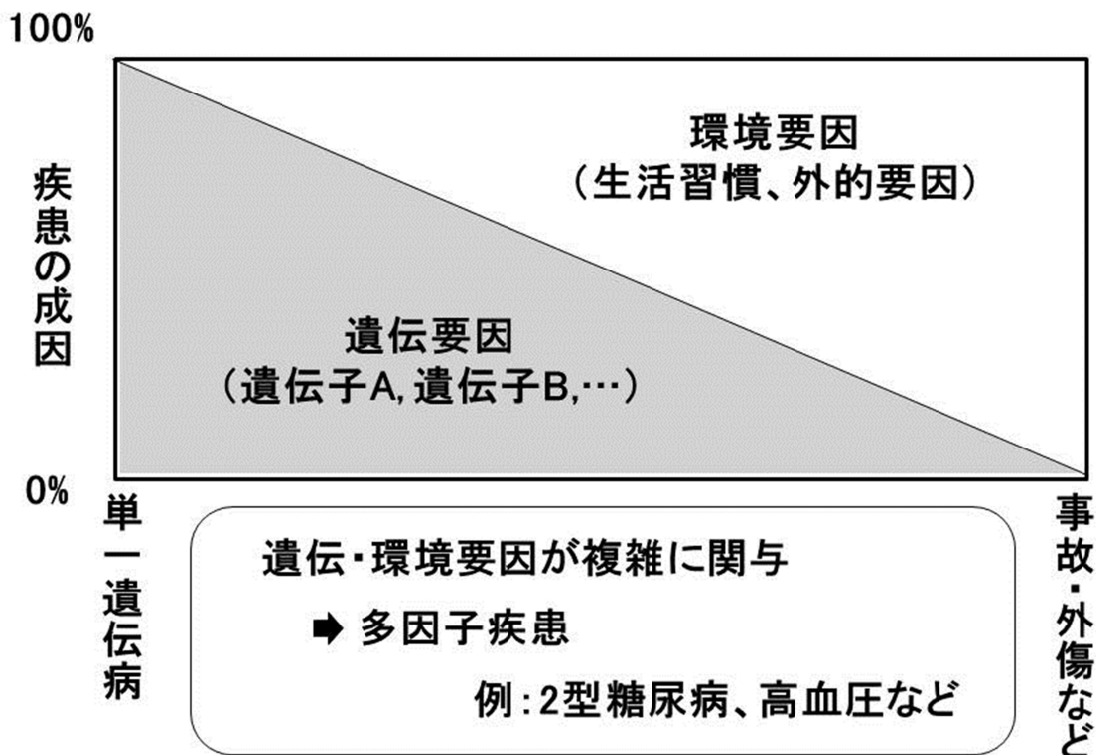


図3 2型糖尿病発症と一塩基多型との関連

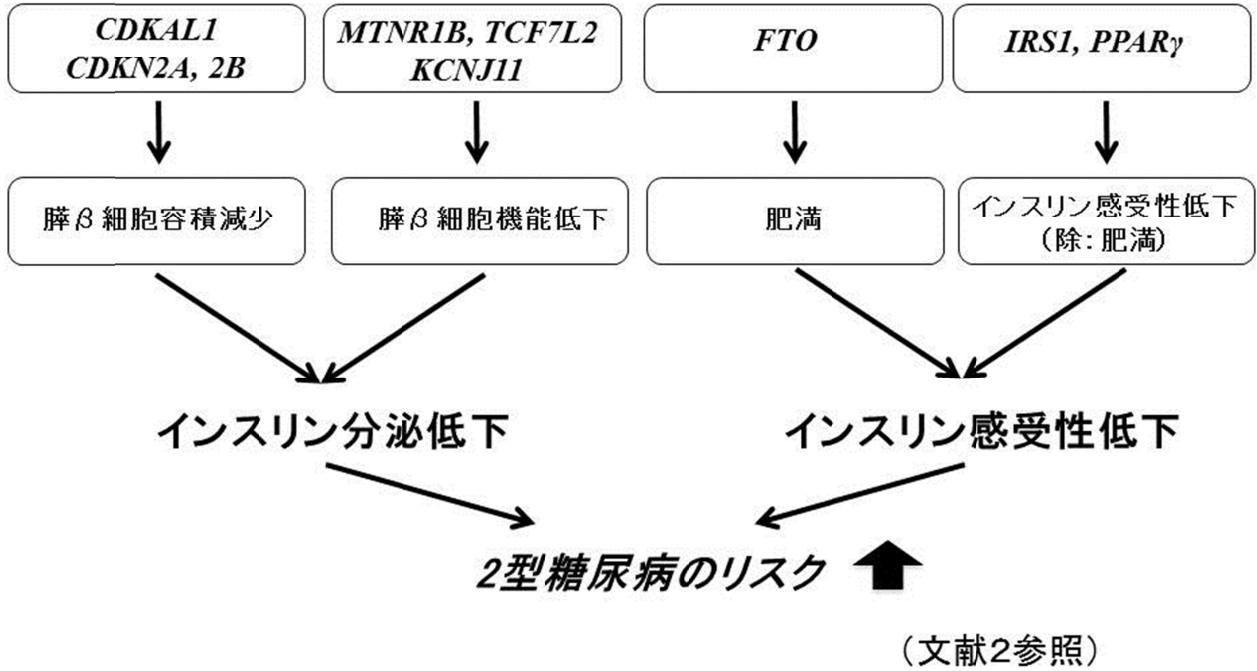
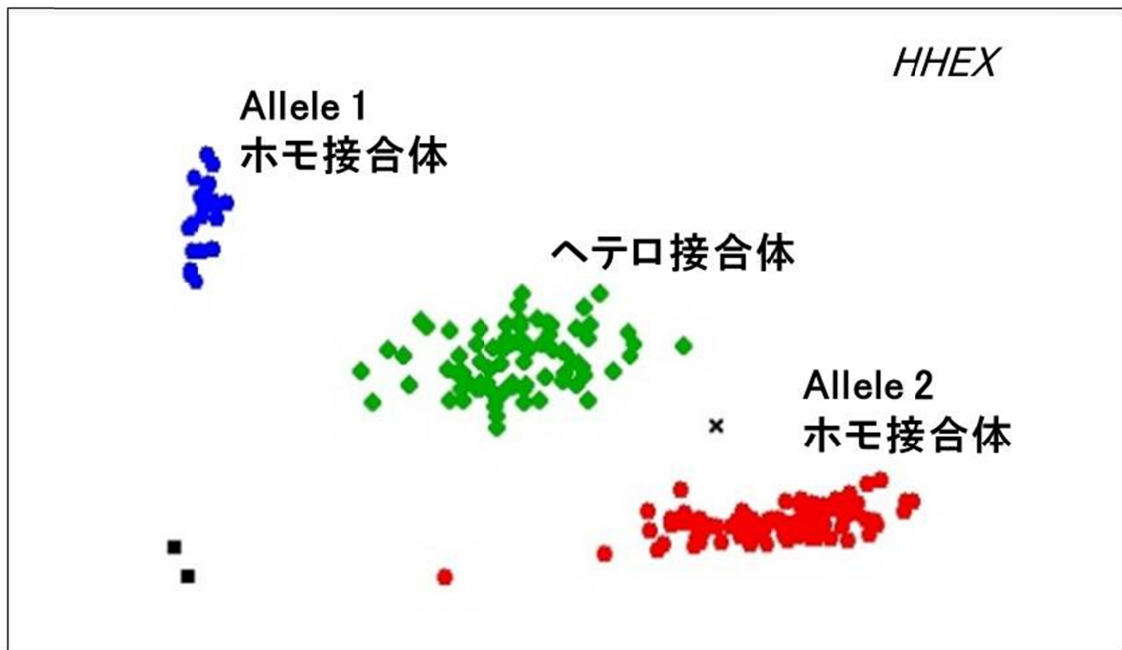
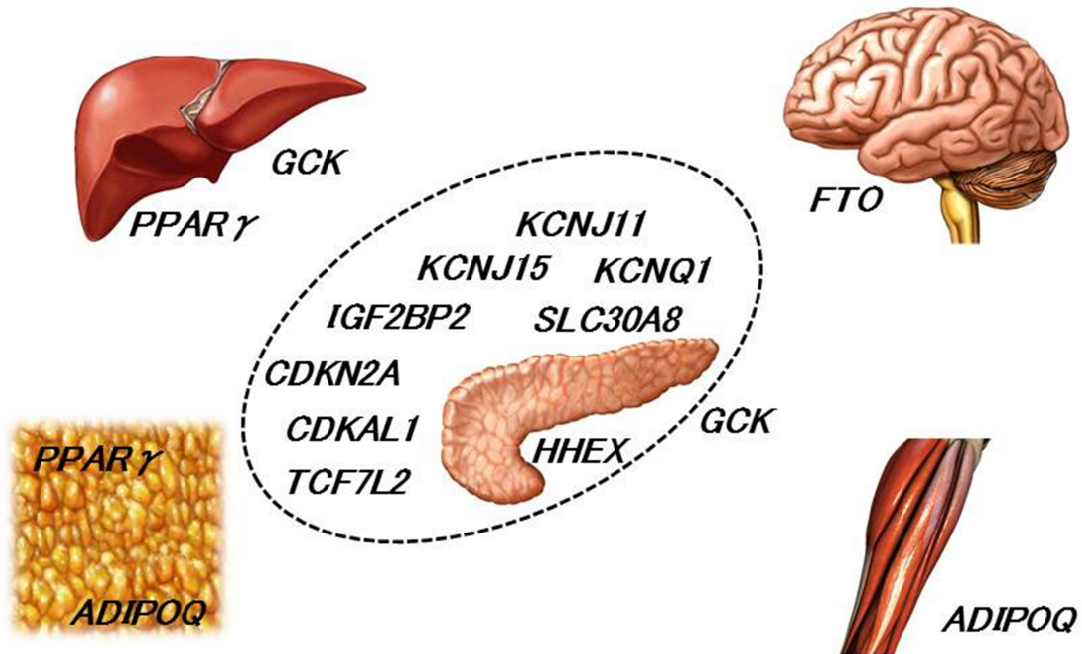


図4 塩基配列解析結果の一例



ホモ接合、ヘテロ接合のシグナルが明瞭に分離

図5 解析遺伝子の主な局在



日本人2型糖尿病関連の遺伝子を破線で囲んだ

表1 塩基多型解析を行った遺伝子

インスリン感受性関連

<i>PPARγ</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
<i>FTO</i>	Fat mass- and obesity-associated
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectin

膵β細胞関連

<i>TCF7L2</i>	Transcription factor 7-like 2
<i>GSK</i>	Glucokinase
<i>KCNJ11, 15</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11, 15
<i>KCNQ1</i>	Potassium channel, voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
<i>HHEX</i>	Hematopoietically expressed homeobox
<i>IGF2BP2</i>	Insulin-like growth factor 2 binding protein 2
<i>CDKAL1</i>	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>SLC30A8</i>	Solute carrier family, member 8

表2 母体背景

	妊娠糖尿病 (n=174)	正常耐糖能 (n=554)	<i>P</i>
年齢	36 ± 5	35 ± 5	0.0028
BMI	21.9 ± 3.5	20.1 ± 2.4	< 0.0001
BMI ≥ 25	31 (17.8%)	23 (4.2%)	< 0.0001
BMI < 18.5	17 (9.8%)	122 (22.0%)	< 0.0001
糖尿病家族歴	44 (25.2%)	40 (7.2%)	0.0004

表3 ケース・コントロール解析

アレル頻度差	インスリン感受性	膵β細胞
傾向あり		<i>HHEX</i>
傾向なし	<i>FTO</i>	<i>KCNJ11</i>
	<i>PPARG</i>	<i>TCF7L2</i>
	<i>ADIPOQ</i>	<i>IGF2BP2</i>
		<i>GCK</i>
		<i>CDKAL1</i>
		<i>CDKN2A</i>
		<i>KCNJ15</i>
		<i>KCNQ1</i>
		<i>SCL30A8</i>